

氏名	しみず ともふみ 清水 智史
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博士甲第 4839 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	生薬および生薬成分の組合せによる生物活性増強メカニズムの解析
論文審査委員	(主査) 教授 木内 文之 (薬学博士) (副査) 教授 須貝 威 (農学博士) 教授 中村 智徳 (博士 (薬学))

## 論文内容の要旨

漢方薬は、複数の生薬を組合せることにより薬効を示す医薬品であり、その有効性は経験的に伝えられてきた。近年、一部の漢方処方でランダム化比較試験等の臨床試験が実施されるなど、西洋医学の観点から改めてその有効性が示されつつある。しかし、多数の成分を含む生薬を複数組合せて薬効を示す漢方処方において、その有効成分が明らかになっている例は少ない。したがって、漢方処方の有効性（薬理作用）に関与する成分を科学的に明らかにすることは、現代医療で漢方処方による治療を進めていく上で最も重要な研究課題である。また、漢方薬は多数の成分からなる薬物であることから、複数の成分の共存による相乗効果が重要であると考えられる。すなわち、生薬成分の組合せによる相乗効果を科学的に解明することは、漢方処方の有効性に関与する成分の解明に貢献する研究課題である。本研究では、相乗効果を示すことが報告されているオウゴンのフラボンについて、相乗効果の作用機序の解析を行うとともに、四逆散を構成する生薬並びにそれらの成分の抗炎症作用を混合物としての作用の観点から解析した。

### 第 1 章 オウゴンのフラボノイドの組合せによる活性増強メカニズムの解析

【背景・目的】申請者の所属する研究室での先行実験において、マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用を指標にした黄連解毒湯の抗炎症作用の処方解析の結果、

構成生薬の一つであるオウゴンが活性本体となる生薬であり、baicalein (B), wogonin (W), oroxylin A (O), 6-methoxywogonin が顕著な活性を示すことが見出されている。さらにこれらの化合物について、水エキス中の各化合物の濃度を HPLC で定量すると

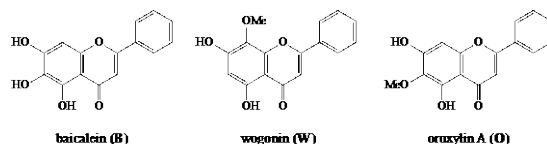


Fig. 1 オウゴンのフラボンの構造式

もに、J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性を比較した結果、これらの化合物をエキス中の比 (baicalein : wogonin : oroxylin A : 6-methoxywogonin = 120 : 47 : 2.7 : 1) で組合せた混合物の活性によりエキスの活性を説明出来ること、さらにこの混合物の活性が各々単独の活性と比較して増強していることが見出されている。本研究では、先行実験者が単離した化合物のうち、アッセイに用いるのに十分な量が確保できている baicalein, wogonin, oroxylin A およびそれらの等モル混合物 (**F-mix**) を用いて、J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生に関わるシグナル伝達経路に対する影響を検討し、フラボノイドの組合せによる生物活性増強メカニズムを解析した。

【方法】 COX-2 酵素阻害活性: COX (human) Inhibitor Screening Assay Kit (cayman) を用いた。

細胞培養: DMEM 培地で培養した J774.1 細胞を、被験物質で前処理後、LPS 存在下で一定時間インキュベートして各種アッセイに用いた。なお、LPS 濃度は先行実験者に合わせて 1 µg/mL とした。

PGE<sub>2</sub> 並びに NO の定量: LPS 添加から 6 時間後の培養上清を用いて、PGE<sub>2</sub> と NO をそれぞれ Prostaglandin E<sub>2</sub> EIA kit (cayman), グリーンス試薬により定量した。

タンパク発現量の比較 1: LPS 刺激から 6 時間後の細胞から、全タンパクを EzRIPA Lysis kit (ATTO) により抽出した。LPS 刺激から 2 時間後の細胞から、核画分のタンパクを NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo) により抽出した。各サンプルのタンパク量をウェスタンブロット法により比較した。

タンパク発現量の比較 2: 4%ホルムアルデヒドを用いて 96 well プレート上に固定した細胞に対して、透過処理後、蛍光免疫染色を行った。DAPI を用いて核染色を行ったのち、CellInsight を用いた画像解析によりタンパク量を比較した。

mRNA 発現量の比較: LPS 刺激から 6 時間時の細胞から、Total RNA を TRIzol (Thermo)により抽出した。RT-PCR 法により mRNA 量を比較した。

レポーター遺伝子アッセイ: DMEM 培地で培養した RAW264.7 細胞に対して、pNF-κB-Luc と pRLTK をエレクトロポレーション法によりトランスフェクションした。サンプルで前処理後、LPS 存在下で 8 時間インキュベート後、Dual Luciferase Assay System (Promega) を用いて細胞を溶解し、化学発光を測定した。化学発光値を、細胞溶解液の総タンパク濃度で補正し、転写活性を比較した。

相乗作用の評価: イソボログラム法を拡張して用いた (**Fig. 2**)。F-mix は 3 つの化合物の等モル混合物であることから、いずれか 1 つの化合物が活性を示さなかった場合には (1)の、すべての化合物が活性を示す場合には(2)の計算式により、組合せた場合の理論的 IC<sub>50</sub> を算出した。理論的 IC<sub>50</sub> と実測値を比較し、実測値が有意に低ければ、相乗作

用を示すと判定した。なお、**F-mix** の濃度は総分子数/溶液体積に基づいて表記した。

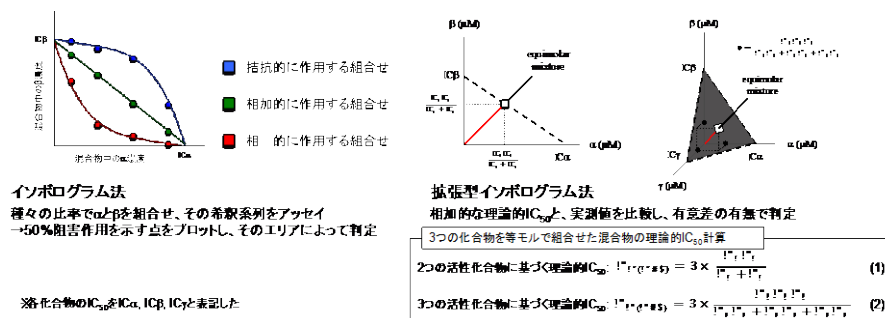


Fig. 2 本研究で用いたインボログラム法の概略図と理論的 IC<sub>50</sub> の計算式

【結果・考察】まず3種のフラボンとその混合物の COX-2 に対する酵素阻害作用を検討した。阻害を示したのは baicalein (IC<sub>50</sub> = 11.7 μM) と oroxylin A (IC<sub>50</sub> = 6.7 μM) であり、wogonin は活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 40 μM)。**F-mix** (IC<sub>50</sub> = 17.7 μM) は COX-2 を阻害したが、相乗作用は示さなかった (IC<sub>50</sub> (calcd) = 12.9 μM)。一方、J774.1 細胞における LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> 産生抑制活性は、baicalein (IC<sub>50</sub> = 16.9 μM), wogonin (IC<sub>50</sub> = 1.88 μM), oroxylin A (IC<sub>50</sub> = 3.67 μM) であり、これらから計算した **F-mix** の理論的 IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub> (calcd) = 3.47 μM)と比較して **F-mix** の IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub> = 0.74 μM) は有意に ( $p < 0.01$ ) 低く、これらの化合物が相乗作用を示していると判断できた。

細胞系において **F-mix** が相乗作用を示したことから、次に細胞内における COX-2 のタンパク発現や mRNA 発現量に対する影響を検討した。ウェスタンブロット法により COX-2 タンパク発現量を比較した結果、baicalein (33 μM, 37.4%), wogonin (33 μM, 37.5%)および **F-mix** (100 μM, 59.2%) が有意な抑制作用を示した。一方、COX-2 の mRNA 発現量に対しては、wogonin (IC<sub>50</sub> = 50.2 μM) と **F-mix** (100 μM, 47.7%) が有意な抑制作用を示し、**F-mix** の抑制率は wogonin の活性で説明できた。

COX-2 の発現に影響するシグナル伝達経路として、NF-κB 経路が報告されていることから、NF-κB の核内移行や転写活性に対する影響を検討した (Fig. 3)。

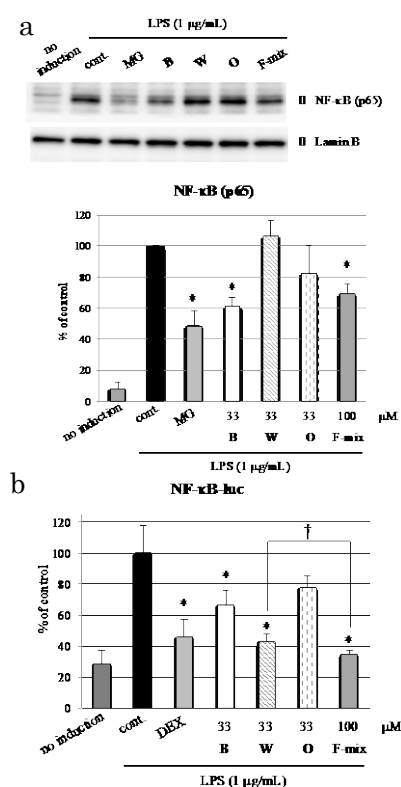


Fig. 3 NF-κB の核内移行 (a) およびレポーター活性 (b) に対する影響  
 $n = 3$  (mean ± S.D.) \* :  $p < 0.01$   
 MG : MG132 (10 μM) DEX : dexamethasone (1 μM)  
 B : baicalein W : wogonin O : oroxylin A  
 F-mix : equimolar mixture of B, W and O

ウエスタンブロット法により NF- $\kappa$ B の核内移行に対する影響を比較した結果、baicalein (33  $\mu$ M, 38.4%), **F-mix** (100  $\mu$ M, 31.2%) が有意な抑制作用を示し、**F-mix** の抑制率は baicalein で説明できた (**Fig. 3a**)。また、baicalein (33  $\mu$ M, 33.4%), wogonin (33  $\mu$ M, 57.3%), **F-mix** (100  $\mu$ M, 65.3%) は RAW264.7 細胞における NF- $\kappa$ B の転写活性を有意に抑制した (**Fig. 3b**)。Wogonin は NF- $\kappa$ B の核内移行に影響しなかったことから、wogonin の作用点は NF- $\kappa$ B の DNA への結合あるいは転写であると考えられ、baicalein の NF- $\kappa$ B の転写活性に対する抑制作用は、NF- $\kappa$ B の核内移行の抑制に基づくと考えられた。**F-mix** の NF- $\kappa$ B の転写活性に対する抑制率は wogonin よりも有意に高かったことから、**F-mix** は baicalein の作用に基づいて核内の NF- $\kappa$ B の量を減少させた上で、wogonin の作用に基づいて NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制すると考えられる。

J774.1 細胞に対する LPS 誘導性 NO 産生抑制活性は、baicalein ( $IC_{50}$  = 30.8  $\mu$ M), wogonin ( $IC_{50}$  = 29.0  $\mu$ M), oroxylin A (44.9  $\mu$ M) であった。これらから算出した **F-mix** の理論的  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  (calcd) = 33.6  $\mu$ M) と比較して、**F-mix** の  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  = 15.3  $\mu$ M) は有意に ( $p < 0.01$ ) 低く、これらの化合物は相乗作用を示していると判断できた。

iNOS の mRNA 発現量に対しては、baicalein ( $IC_{50}$  = 37.8  $\mu$ M) と wogonin ( $IC_{50}$  = 11.6  $\mu$ M) が有意な抑制作用を示し、**F-mix** の  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  = 8.6  $\mu$ M) は理論値 ( $IC_{50}$  (calcd) = 26.6  $\mu$ M) より有意に ( $p < 0.01$ ) 低かったことから、これらの化合物は相乗作用を示すと判断した。iNOS タンパク発現量に対する影響について、ウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法との結果を比較したところ、両者の結果は高い相関を示したことから、以降は蛍光免疫染色法に基づいてタンパク発現量に対する影響を比較した。iNOS のタンパク発現量に対する抑制活性は、baicalein ( $IC_{50}$  = 22.6  $\mu$ M), wogonin ( $IC_{50}$  = 21.5  $\mu$ M), oroxylin A ( $IC_{50}$  = 36.8  $\mu$ M) であった。**F-mix** の  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  = 10.7  $\mu$ M) は、理論値 ( $IC_{50}$  (calcd) = 25.5  $\mu$ M) と比較して有意に ( $p < 0.01$ ) 低かったことから 3 種の化合物は相乗作用を示すと判断した。

I $\kappa$ B のリン酸化に対する影響を蛍光免疫染色法で比較した結果、baicalein (33  $\mu$ M, 38%) と **F-mix** (100  $\mu$ M, 42%) が抑制作用を示し、**F-mix** の抑制率は baicalein で説明できた。Nrf2 に対する影響を蛍光免疫染色法で比較した結果、wogonin (100  $\mu$ M), oroxylin A (11~100  $\mu$ M) が有意な発現増加作用を示した。**F-mix** は 100  $\mu$ M において有意な発現増加作用を示し、11, 33  $\mu$ M においても増加傾向を示したことから、**F-mix** の Nrf2 発現増加作用には主として oroxylin A が寄与していると考えられた。

【結論】個々の化合物の主たる作用は、baicalein は I $\kappa$ B のリン酸化およびそれに続く NF- $\kappa$ B の核内移行の抑制、wogonin は NF- $\kappa$ B の転写活性の抑制、oroxylin A は COX-2 酵素活性の阻害と Nrf2 発現量の増加であることを明らかにした。このように、**F-mix** を構成する個々の化合物は、構造は類似しているにも関わらず LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> や NO 産生に関わる NF- $\kappa$ B 経路の異なる段階を阻害していた (Fig. 4)。一方で、**F-mix** は I $\kappa$ B のリン酸化や NF- $\kappa$ B の核内移行、COX-2 酵素活性といった個々の作用点に対しては相乗作用を示さなかった。したがって、**F-mix** が示す LPS 誘導性 PGE<sub>2</sub> や NO 産生に対する相乗的な抑制作用は、個々の化合物の作用によって、NF- $\kappa$ B の一連のシグナルが多段階的に抑制されることに基づく結論付けた。本研究はオウゴンのフラボノイドを組合せてシグナル分子への影響を比較した初めての試みであり、オウゴンの抗炎症作用の作用機序の解明に結びつく新たな知見を得たものである。

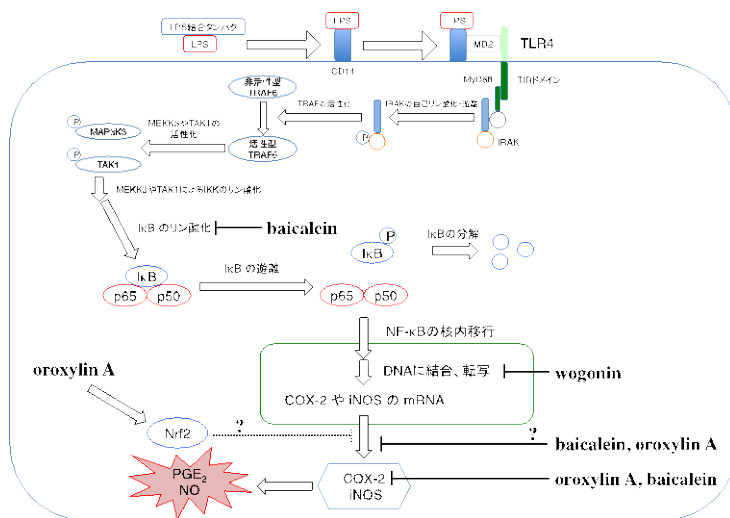


Fig. 4 オウゴンのフラボノイドの作用点

## 第2章 四逆散の抗炎症作用に関する処方解析

【背景・目的】 四逆散は、サイコ(B)、シャクヤク(P)、キジツ(I)、カンゾウ(G)で構成される漢方処方であり、体力中等度以上で、胸腹部に重苦しさがあり、不安不眠のあるものに用いられる。臨床では胆嚢炎や慢性副鼻腔炎などの炎症性疾患にも用いられるため、四逆散の薬効には抗炎症作用が関わっている可能性がある。申請者の所属する研究室で行われた、J774.1 細胞を用いた四逆散および構成生薬の水エキス混合物の LPS 誘導性 NO 産生抑制作用の比較の結果、**B+P+I** もしくは **B+P+G** の組合せにより四逆散の活性を説明できることが見出された。さらに、単独で最も活性の低いシャクヤク(P)を抜くと、顕著に活性が低下したことから、四逆散の活性にはシャクヤク(P)の寄与が大きいことが示唆された。さらに先行実験者は、これらの組合せのうち個々の活性の低い生薬の組合せである **B+P+I** に着目し、「シャクヤクの水エキス(P)」と「サイコとキジツの水エキスの混合物(BI)」との組合せが相乗作用を示すことを見出したが、その相乗作用に関与する化合物や、相乗作用のメカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、シャクヤクの成分を分離し、**BI** との相乗作用を示す化合物を見出す

こととした。

【方法】細胞アッセイ: J774.1 細胞に対する各種アッセイを、第 1 章と同様の手順で行った。なお、LPS 濃度は先行実験者に合わせて 100 ng/mL とし、NO の定量を LPS 刺激から 24 時間後に行った。

相乗作用の判定: 個々のサンプルの % of control の値 (% of LPScont と表現する) の積から期待値を算出した (Fig. 5 左)。また、BI を control とした際の組合せ時の値 (% of BI と表現する) を算出した (Fig. 5 右)。% of BI において、実測値が有意に高い抑制率であれば、相乗作用を示すと判定した。

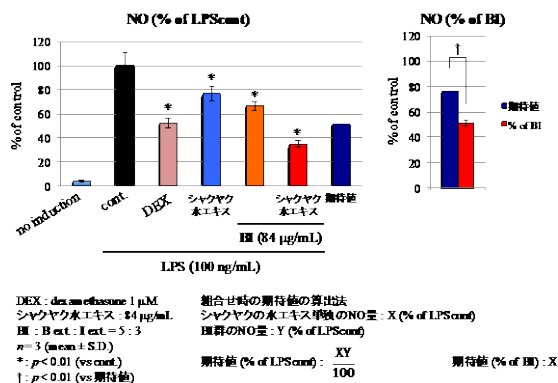


Fig. 5 BI との組合せによる相乗作用の判定

【結果・考察】 シャクヤクの水エキスを、DIAION HP-20, Sepabeads SP207, シリカ

ゲル, Cosmosil 75C<sub>18</sub>-OPN を用いて分画し、15 種の既知化合物を単離・同定した。単離した化合物のうち paeonilactone A (11p) は、単独で用いた場合には有意な NO 産生抑制作用を示さなかった (50 μM, % of LPScont: 89.2%)ものの、BI と組合せた場合の % of BI (50 μM, 69.9%)は、期待値 (= 89.2%)と比較して有意に低かったことから、paeonilactone A (11p) は BI との相乗作用を示すと考えられた。さらに、iNOS タンパク発現量に対しても組合せによる相乗作用を示した。一方で iNOS の mRNA 発現量に対しては相加的に、IFN-βの mRNA 発現量に対しては拮抗的に作用した。

Paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は NO 産生抑制作用・iNOS タンパク発現抑制作用・iNOS や IFN-βの mRNA 発現抑制作用を示した。なお、これらの化合物は BI と組合せた場合、相加的に作用すると考えられた。

活性を示した化合物並びに BI を用いて、NF-κB の核内移行や MAPK のリン酸化に対する影響を検討した結果、paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は ERK のリン酸化を抑制した。一方、paeonilactone A (11p) や BI は NF-κB の核内移行や MAPK のリン酸化には影響しなかった。

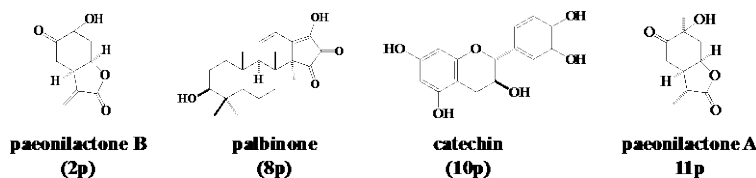


Fig. 6 活性を示した単離化合物

【結論】 シャクヤクより単離した化合物のうち、paeonilactone A (11p) は単独で用いた場合には NO 産生抑制作用を示さないが、BI と組合せた場合に濃度依存的な抑制

作用を示すことを見出した。Paeonilactone B (2p), palbinone (8p), catechin (10p) は、ERK のリン酸化を抑制することにより、NO 産生量を抑制することが示唆された。シャクヤクの生物活性に関しては、主要成分である paeoniflorin の生物活性に着目した報告が多い。また catechin (10p) はシャクヤク以外の生薬などにも含まれており、生物活性の報告は多数存在する。これに対し、paeonilactone B (2p), palbinone (8p), paeonilactone A (11p) の生物活性に関する報告はほとんど存在しないことから、本研究で見出したこれらの化合物の生物活性に関する知見は、シャクヤクの有効性の科学的な解明に繋がる成果である。

## 論文審査結果の要旨

博士論文発表は、平成 30 年 2 月 23 日（金）13 時から、慶應義塾大学薬学部 1 号館地下 1 階マルチメディア講堂にて、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。なお、本発表の前に、副査 2 名による事前の個人面接が行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。

25 分間の口頭発表では、研究の背景並びにそこにある問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問の趣旨に即して概ね的確な応答がなされた。

学位申請論文は、生薬成分の組合せ並びに生薬の組合せである漢方処方における成分間の相乗作用に焦点を当てたものであるが、本発表では原著論文として公表されている炎症メディエーターの産生抑制における 3 種のフラボンによる相乗作用のメカニズムに関する研究結果が述べられた。

清水君は、先行研究で培養細胞において LPS 誘導性の PGE<sub>2</sub> 産生を相乗的に抑制することが明らかにされている baicalein, wogonin, oroxylin A の 3 種のフラボン並びにこれらの混合物について、LPS 刺激から PGE<sub>2</sub> 並びに NO 産生に至る一連のシグナル伝達経路への影響を調べることで相乗作用のメカニズムを解析した。発表では、個々のステップに対する影響の評価法並びに結果とともに、結果に対する考察が述べられ、3 種のフラボンは、COX-2 反応、NF-κB の核内への移行といった個々のステップでは相乗的に作用せず、各々構造は類似しているにもかかわらずシグナル伝達系の異なるステップを主として阻害し、3 種の混合物は一連のステップを多段階的に抑制することによって相乗的な抑制作用を示すとの結論が提示された。

発表後の試問では、実際に煎液を服用した際の有効性について、化合物の物性や細胞内への移行性の観点から、さらに生薬中とは異なる混合比で評価している点などについて訊ねられ、実験結果や文献事例に基づいた説明がなされた。また、相乗効果の理論的背景や PGE<sub>2</sub> と NO の産生に対する影響の違い、3 種のフラボンの標的分子に関する考察を求められ、実験結果、文献事例並びにドッキングスタディの結果を交えた説明がなされた。



清水君の学位請求論文で提示された成果は、漢方処方の有効性を化合物レベルで明らかにする研究であり、この領域の今後の研究に一つの方向性を示すものとして高く評価できる。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

須貝 威 教授： オウゴンに含まれるフラボンであるバイカリン、オウゴニン、オロキシリンAそれぞれ単独ではなく、混合することによって活性が増強する現象を、各成分の濃度を詳細に設定した上、細胞・酵素・遺伝子レベルで測定した。結果は多次元イソボログラム法により定量的に評価し、相乗作用がなぜ、どのように起こっているか、非常に深く考察した。新しい創薬シード開拓の源泉となる研究である。四逆散を構成する4成分についても詳細に検討し、その中に含まれるシャクヤクに関し、これまで漠然としていた有効性の機序解明に大きな突破口を与えた。論文は本文・実験の部とも全て確固たるエビデンスと定量的評価に裏打ちされており、博士（薬学）の学位に相応しい研究内容といえる。

中村 智徳 教授：本研究は生薬の持つ薬効が、単一の含有化合物のみに由来するのではなく、複数の化合物が混合した状態で発揮されることを、分子薬理学的解析から明らかにした点で、生薬・天然物化学の研究分野にとって非常に価値の高いものであり、博士（薬学）の学位に相応しいものと判断した。

また、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議では、特に問題となる点の指摘はなく、清水智史君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Shimizu T., Shibuya N., Narukawa Y., Oshima N., Hada N., Kiuchi F.; Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin A mixture: Multistep inhibition of the NF-kB signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of Scutellaria root flavonoids. J Nat Med (2018) **72**: 181–191

### 【参考論文】

Kawahara Y., Hoshino T., Morimoto H., Shimizu T., Narukawa Y., Fuchino H., Kawahara N., Kiuchi F.; LC-MS-based quantification method for Achyranthes root saponins. J Nat Med (2016) **70**: 102–106 and 300